

論文内容要旨

論文題目

ヒト胆汁からの高純度 Extracellular vesicle 分離法の確立と
胆管癌バイオマーカーの探索

責任講座： 内科学第二講座

氏名： 池田 千咲

【内容要旨】 (1,200 字以内)

【背景】胆管癌は予後不良な難治性癌だが、胆管は解剖学的に細長い構造で、内視鏡的アプローチも容易でないことから、画像診断および組織学的診断が困難な疾患である。細胞外小胞(Extracellular vesicle : EV)はあらゆる細胞から放出されており、その内部には細胞由来の蛋白質や核酸が安定した状態で含まれていることから、癌の新規バイオマーカーとして注目されている。胆汁は胆管癌に接していることから、胆汁由来 EV は癌のバイオマーカーをより高濃度に含まれている可能性が高い。本研究では、ヒト胆汁由来 EV のプロテオーム解析を行い、胆管癌の新規バイオマーカーの同定を行った。

【方法】①EV 抽出は超遠心法を用い、溶解液として Phosphate-buffered saline (PBS) およびキレート剤 (50mM EDTA/50mM EGTA in PBS : EDEG) を使用し比較検討を行った。検討方法は透過型電子顕微鏡検査、Western blot でのエクソソームマーカー解析、ナノ粒子トラッキング解析、Bioanalyzer による RNA の品質評価を行った。②次に胆管癌(CCA) 10 例、コントロールとして胆管結石症(stone) 10 例の計 20 例を対象に、経鼻胆道ドレナージチューブ(NBD)より胆汁を採取しプロテオーム解析を行った。さらにマーカー候補蛋白質について検証コホート (CCA 8 例、stone 8 例) で ELISA を行った。

【結果】①ヒト胆汁から分離した小胞は EDEG 群、PBS 群ともに直径 40-100nm で、典型的な円形、カップ型として確認された。また CD9、ALIX、Flotillin-2 などのエクソソームマーカーの発現を認め典型的な EV と考えられた。EV 由来 RNA 量は EDEG 群でより高値であった。Bioanalyzer では small RNA 中の microRNA の割合が EDEG 群で高かった。また EDEG を用いることで、血清 Albumin や Immunoglobulin などの夾雑物をより多く除去した。②プロテオーム解析により、胆管癌の高発現蛋白質として 166 種の蛋白質が同定された。最も統計学的有意差を示した Claudin-3 において検証コホートを用いて ELISA を行った。診断精度は AUC 0.945 (95%CI 0.84-1)、感度 87.5%、特異度 87.5%であった。

【結論】 EDEG を用いることでヒト胆汁からの高純度な EV 分離が可能であった。また胆管癌におけるヒト胆汁由来 EV 中蛋白質のプロテオーム解析により、ヒト胆汁由来 EV 中の Claudin-3 が胆管結石症と胆管癌の鑑別に有用なバイオマーカーであることを示した。

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 池田 千咲

論文題目：ヒト胆汁酸からの高純度 Extracellular vesicle 分離法の確立と胆管癌バイオマーカーの探索

審査委員：主審査委員 中 島 修
副審査委員 元 井 冬 彦
副審査委員 今 田 恒 夫



審査終了日：令和 2 年 8 月 11 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

体液中に含まれる細胞外小胞 (Extracellular vesicle, EV) は、エクソソーム、マイクロベジクル、アポトーシス小体の総称であり、放出する細胞内由来のタンパク質や核酸が安定した状態で含まれていることから、体液中のバイオマーカー検索ターゲットとして、近年、注目を集めている。ただし、血液などの循環する体液中の EV は体内で起こるすべての変化を反映してしまうという欠点がある。

胆管癌は、画像診断や組織学的診断が困難な難治性癌であり、確度の高い診断法の確立が求められているが、胆管癌の血清由来 EV に含まれるバイオマーカーとして、Aminopeptidase N などの報告があるが、同時に存在する他疾患の影響を排除することは出来ない。

本研究において、池田氏は、胆汁が非循環体液であり、胆管以外の臓器での影響を受けにくく、胆管癌診断に適した体液と考えられること、また、ヒト胆汁由来 EV 中のタンパク質胆管癌バイオマーカーの報告がないことから、胆管癌バイオマーカーとなる、胆汁中 EV 内で発現するタンパク質の同定を試みている。ヒト胆汁は、種々の条件により性状が変化しやすく、胆汁から EV を安定に分離する方法が確立されていないことから、池田氏は、EV 分離において夾雑物除去に有用と報告されているキレート剤 (EDTA および EGTA) を抽出液 (PBS) に添加することで、miRNA が高濃度に含まれ、血清アルブミンなどの夾雑タンパク質が効率的に除去された EV 画分を胆汁から得ることに成功している。

胆管癌の新規バイオマーカーを探索するため、胆管癌 10 例、胆管結石症 (コントロール) 10 例の胆汁に対して、同法を用いて分離した EV に対する、プロテオーム解析を行い、胆管癌群で、胆管結石症群よりも有意に 2 倍以上、発現が亢進しているタンパク質を 166 種同定した。同定したタンパク質の上位 4 種の発現を、胆管癌、胆管結石症 (コントロール) 各 4 例の検証群の胆汁に対する ELISA を行ったところ、Claudin3 が胆管癌群で有意に発現の上昇が認められ、Claudin3 が新規タンパク質胆管癌マーカーとなることを示唆した。

本研究では、胆汁中 EV 分離法の改良を行い、プロテオーム解析に適した、夾雑タンパク質の少ない高品質な EV 精製を可能にし、さらに、これまで先行研究がない胆汁中 EV 中のタンパク質のプロテオーム解析から、Claudin3 が新規胆管癌バイオマーカーとなることを見出した。加えて、検証群に対するバイオマーカー解析では、胆汁に対して、院内で容易に試行できる ELISA を用いており、胆管癌バイオマーカー検査の実用性についても検討されており、本研究の成果の今後の発展が期待される。

以上から、審査会では、本研究が学位 (医学博士) の授与に値するものと判定した。

(1, 200 字以内)